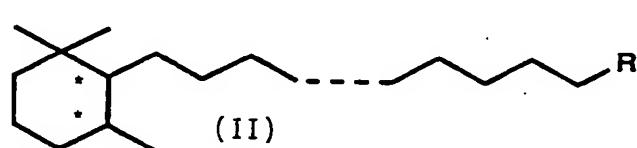




## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C07C 403/08, 31/135, 33/025 A61K 31/045		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/11343 (43) Date de publication internationale: 26 mai 1994 (26.05.94)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01059</p> <p>(22) Date de dépôt international: 28 octobre 1993 (28.10.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 92440127.6 18 novembre 1992 (18.11.92) EP (34) Pays pour lesquels la demande régionale ou internationale a été déposée: AT etc.</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MEDAFOR [FR/FR]; Parc d'Innovation, Route du Rhin, Immeuble Platon, F-67400 Illkirch-Graffenstaden (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : LUU, Bang [FR/FR]; 27, rue Kamm, F-67000 Strasbourg (FR). BORG, Jacques [FR/FR]; 74a, avenue de Périgueux, F-67800 Bischheim (FR). BECK, Alain [FR/FR]; 14, quai de l'Ill, F-67400 Illkirch (FR). LAABICH, Aicha [FR/FR]; 3, place Lamartine, F-67400 Illkirch (FR). CRESTANI, Florence [FR/FR]; Résidence Antigone, 273, route de Lyon, F-67400 Illkirch (FR). NEVEUX, Odile [FR/FR]; 1, rue d'Alsace, F-67800 Bischheim (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: LITTOLFF, Denis; Meyer &amp; Partenaires, 20, place des Halles, Bureaux Europe, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: LONG CHAIN FATTY ALCOHOLS WITH NEUROTROPHIC AND PARAMNESIC ACTIVITY, AND METHOD OF PREPARATION</p> <p>(54) Titre: ALCOOLS GRAS A LONGUE CHAINE A ACTION NEUROTROPHIQUE ET PROMNESIANTE, ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION</p> <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p> <p>ou / or</p>    <p>(II)</p> </div> <p>avec / with</p> <p>R= -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</p> <p>ou / or</p> <p>R= -CH=CHCH<sub>2</sub>OH, cis[ou]trans</p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>New long chain fatty alcohol derivatives, characterized by general formulas (I) or (II) whose linear hydrocarbon side chain has from 7 to 25 carbon atoms, is saturated or has a double bond with a configuration <i>cis</i> or <i>trans</i> at <math>\beta</math> of the alcohol function, but has no ramification.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Nouveaux dérivés d'alcools gras à longue chaîne, caractérisés par les formules générales (I) ou (II) dont la chaîne latérale hydrocarbonée linéaire compte de 7 à 25 atomes de carbone, est saturée ou comporte une double liaison de configuration <i>cis</i> ou <i>trans</i> en <math>\beta</math> de la fonction alcool, mais ne comporte aucune ramifications.</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MC	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## 1

ALCOOLS GRAS A LONGUE CHAINE A ACTION  
NEUROTROPHIQUE ET PROMNESIANTE, ET LEUR PROCEDE DE  
PREPARATION

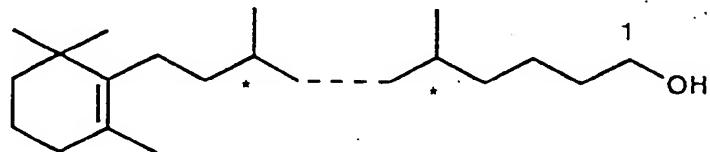
5

10

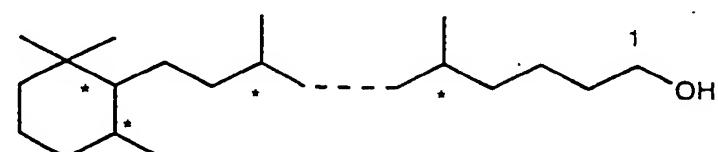
La présente invention concerne un nouveau groupe d'alcools gras à longue chaîne possédant des propriétés utiles dans le traitement des maladies neurodégénératives et pour la récupération fonctionnelle à la suite de lésions du tissu nerveux ou au cours du vieillissement cérébral ou encore pour améliorer les fonctions cognitives chez un sujet sain, en particulier sa mémoire.

15

La Déposante a déjà décrit dans le brevet PCT N° WO 91/05754 une large famille de dérivés d'alcools gras dans laquelle un sous-groupe est constitué d'une chaîne hydrocarbonée linéaire comprenant 7 à 25 atomes de carbone, comportant éventuellement des doubles liaisons et portant à une extrémité une fonction alcool primaire et à l'autre extrémité un radical cyclohexyle substitué par des groupes méthyle, ce sous-groupe répondant à la formule générale:



ou



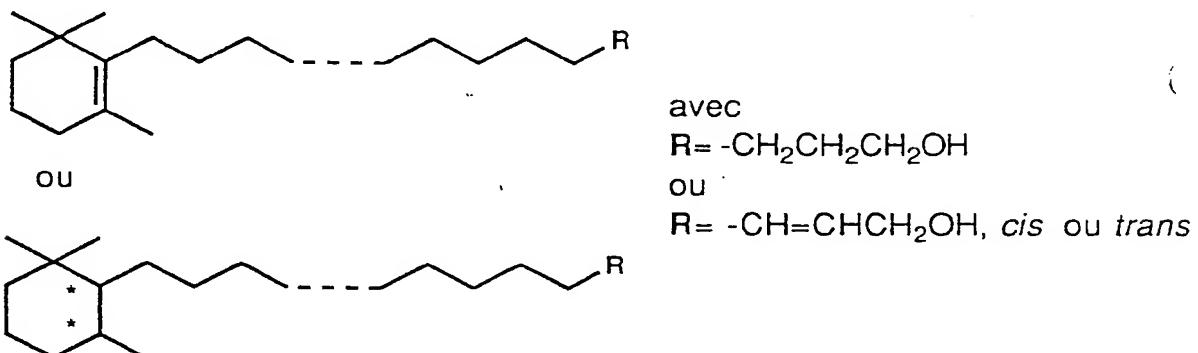
20

Les membres de ce sous-groupe présentent des propriétés biologiques intéressantes dans la mesure où l'expérimentation *in vitro* a démontré qu'ils favorisent la différenciation et la survie neuronale et *in vivo* qu'ils sont capables de compenser les déficits comportementaux après lésion cérébrale.

5 Ils peuvent être présentés sous forme de préparations pharmaceutiques utilisables en médecine humaine pour le traitement de nombreuses affections, qui sont énumérées en détail dans le WO 91/05754 précité.

Le nouveau groupe de composés selon l'invention est constitué par les composés de formule générale:

10



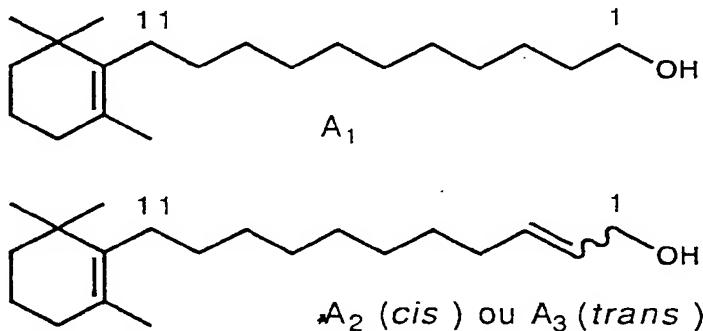
dans laquelle ladite chaîne comporte 7 à 25 atomes de carbone, et est saturée ou comporte une double liaison de configuration *cis* ou *trans* en  $\beta$  de la fonction alcool primaire.

15

Cette particularité représente un avantage considérable, dans la mesure où l'absence complète ou même seulement la diminution du nombre de carbones asymétriques réduit considérablement les difficultés de synthèse conduisant à l'obtention de produits optiquement purs.

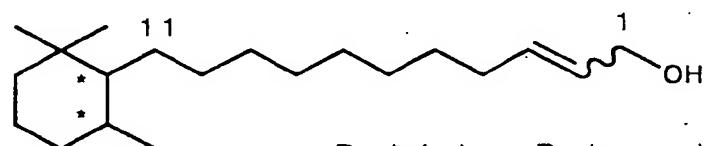
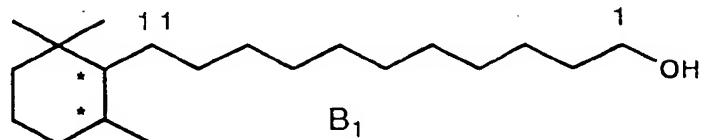
20

A titre d'exemple les composés A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub>, appartenant à ce groupe, et de formule:



ne comportent qu'un seul isomère théorique.

De même, les composés B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub>, appartenant à ce groupe, et de formule:

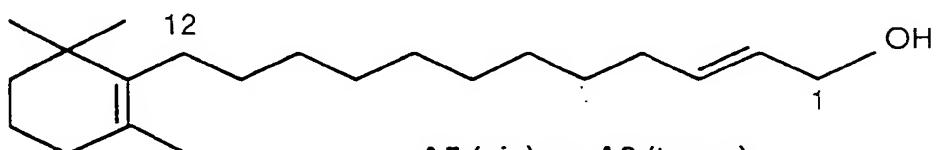
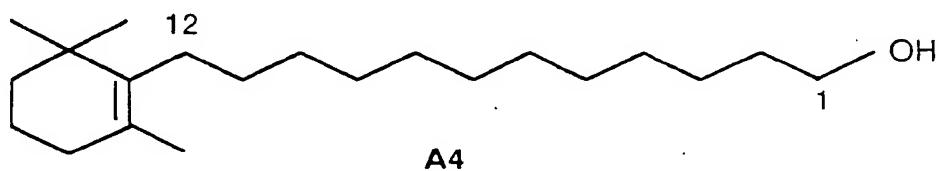


B<sub>2</sub> (*cis*) ou B<sub>3</sub> (*trans*)

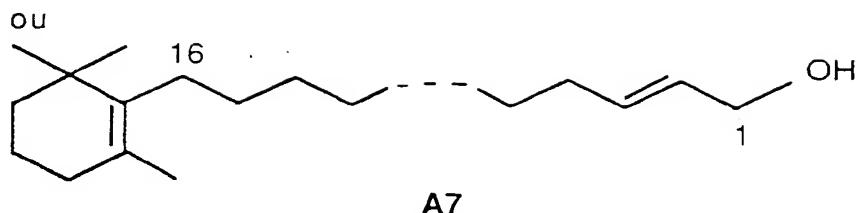
ne comportent que quatre isomères théoriques et deux en pratique, dans le cas d'une hydrogénéation catalytique à partir des précurseurs de type A correspondant.

Ce nombre d'isomères est très faible si on le compare par exemple à celui des isomères du composé le plus voisin de B<sub>1</sub>, mais portant deux groupes méthyle en positions 5 et 9, qui est de 16. Cette limitation des problèmes de stéréochimie a pour avantage, outre la réduction des difficultés de synthèse et l'accroissement de la pureté des produits, de limiter le nombre d'études biologiques, et corolairement d'augmenter les chances d'enregistrement de ces produits par les autorités administratives dans les pays où l'on envisage l'exploitation commerciale de ces produits.

L'invention n'est naturellement pas limitée aux exemples identifiés par A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> ci-dessus, mais englobe d'autres composés tels que



A<sub>5</sub> (*cis*) ou A<sub>6</sub> (*trans*)



qui se sont révélés présenter une activité, d'ailleurs variable  
 5 vis-à-vis de la population neuronale, ce qui implique une modulation dans la sélection entre tous les composés selon l'invention en fonction de chaque cas particulier.

Ainsi, d'une manière générale, les composés selon l'invention favorisent la différenciation (extension de neurites) et la survie neuronale *in vitro* chez le  
 10 rat. Ils peuvent donc être utiles dans le traitement des maladies neurodégénératives et pour la récupération fonctionnelle à la suite de lésions traumatiques ou chimiques du tissu nerveux. Par ailleurs il a été constaté que, outre leur effet neurotrophique sur des sujets malades ou vieillissants, les nouveaux composés selon l'invention exercent un effet neurotrophe sur des  
 15 sujets sains et normaux, favorisant et améliorant leurs capacités cognitives.

Enfin, il a été également constaté que les nouveaux composés selon l'invention exercent une action promnésiante sur les sujets sains, cette action se manifestant sur toutes les formes de mémoire, telles que la mémoire à court (ou long) terme, la mémoire de travail et la mémoire spatiale, olfactive ou  
 20 visuelle.

Bien entendu, compte tenu de ce champ d'applications extrêmement vaste, les doses efficaces des composés seront variables selon les effets recherchés, la voie d'administration et autres facteurs.

Ainsi, si d'une manière très générale, on peut évaluer l'intervalle de doses efficaces approximativement à 0,1 - 100 mg/kg, avec un optimum vers 5 - 50 mg/kg, pour certaines applications, telles que notamment la recherche d'effets promnésiants, l'intervalle utile se situe vers la zone inférieure de cet intervalle général, à savoir dans un domaine d'environ 0,1 - 3 mg/kg, les doses pouvant même être inférieures à 0,1 mg/kg dans le cas de l'administration chronique du produit actif. En prenant ce cas en compte, la limite inférieure de l'intervalle de doses se situe alors à 0,01 mg/kg.

L'invention vise donc également les compositions pharmaceutiques contenant au moins un dérivé selon l'invention, à des doses efficaces

comprises très approximativement entre 0,01 et 100 mg/kg (administration unique ou répétée), administrables par voie topique, orale, intra-cérébrale, intra-musculaire, intraveineuse ou parentérale, cette dose pouvant se situer dans l'intervalle 0,01 - 3 mg/kg dans le cas de la recherche d'effets 5 prométiants par administration chronique. La voie orale est considérée comme préférable et permet d'obtenir un bon passage cérébral à un taux compatible avec l'effet thérapeutique recherché.

Le rapport cerveau/sang est nettement supérieur à un, 6 heures après 10 l'administration, et témoigne d'une bonne affinité des molécules pour le tissu nerveux. La concentration maximale est obtenue dans le cerveau entre 6 et 24 heures après l'administration orale.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront au cours de la 15 description qui suit du processus de synthèse des composés A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub>, pris à titre d'exemple, ainsi que de l'exposé des essais biologiques *in vitro* et *in vivo* auxquels il a été procédé, des effets du composé A<sub>3</sub>.

#### 1) Synthèse chimique des composés de l'invention.

Le processus de synthèse des composés A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub> est illustré par les 20 figures 1 et 2 du dessin annexé, qui schématisent les deux séries d'étapes constituant l'ensemble de ce processus, à savoir:

- les étapes a et b consistent à préparer en premier lieu un synthon linéaire, à partir du 1,10-décanediol, qui à l'étape a est protégé par la formation de l'éther de tétrahydropyrannyle et dont la fonction alcool libre restante est oxydée en aldéhyde à l'étape b.

25 - les étapes c et d consistent à préparer un autre synthon linéaire, permettant de préparer les composés de type A et B de manière plus directe. Le 1,10-décanediol est bromé à l'étape c en présence d'acide bromhydrique et la fonction alcool libre est protégée par la formation de l'éther de tétrahydropyrannyle à l'étape d.

30 - les étapes e à m consistent à préparer l'autre partie des molécules, à partir du bromure de géranyle, substitué en sulfone à l'étape e, que l'on cyclise à l'étape f.

La sulfone cyclisée est alors:

35 1) soit (étape g) couplée à l'aldéhyde obtenu à l'étape b, pour obtenir l'hydroxysulfone. Par élimination à l'étape h on obtient le composé diénique

correspondant, dont la double liaison (exocyclique) est réduite par hydrogénéation catalytique à l'étape j.

2) soit (étape j) couplée au bromure obtenu à l'étape d, pour obtenir la sulfone à longue chaîne. Le groupe phényl sulfone est éliminé à l'étape k.

5 L'éther de tétrahydropyrannyle du composé A<sub>1</sub> obtenu par les 2 voies de synthèse, étapes j ou j, est déprotégé à l'étape l.

Une hydrogénéation catalytique permet de passer du composé A au composé B à l'étape m.

10 Les composés A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> sont synthétisés de manière analogue aux composés A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub>, par couplage avec les synthons adéquats correspondants.

On va maintenant, à titre d'exemple, donner les modes opératoires détaillés des étapes a à m du processus de synthèse des composés A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub> selon l'invention.

Etape a: préparation du 1,10-décanediol monoprotégé: (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>=258).

15 On solubilise le 1,10-décanediol (5 g; 28,7 mmoles) dans 20 ml de dioxane anhydre, et on ajoute 1 éq de dihydropyranne (DHP) et 0,1 éq d'acide *p*-toluènesulfonique (pTsOH). Après 2 heures de réaction, la phase organique est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, de chlorure de sodium, puis séchée avec du sulfate de magnésium et évaporée. Le produit est purifié par chromatographie sur silice (hexane/éther: 65/35). Le rendement est de 27% (2 g; 7,74 mmoles). TLC (hexane/éther: 5/5): R<sub>f</sub>=0,34.

Etape b: préparation du 10-(tétrahydropyran-2-oxy)-1-décanal: (C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>=256). On solubilise l'alcool obtenu à l'étape a (2 g; 7,74 mmoles) dans du dichlorométhane anhydre et on l'ajoute à une solution de chlorochromate de pyridinium (3,3 g; 15,5 mmoles; PCC) dans 100 ml de dichlorométhane à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange est filtré ensuite sur colonne de Florisil (éluant: hexane/éther: 1/1) puis purifié par chromatographie sur colonne de silice (hexane/éther: 9/1). Le rendement est de 70% (1,39 g; 5,42 mmoles).

30 Etape c: préparation du 10-bromo-1-décanol: (C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>OBr=237). On solubilise le 1,10-décanediol (12 g; 69 mmoles) dans du cyclohexane (170 ml) et une solution aqueuse d'acide bromhydrique à 48% (170 ml) et on chauffe à reflux pendant 3 heures. Après refroidissement on neutralise la phase organique avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et on extrait avec de l'hexane. Le bromoalcool est purifié par chromatographie sur

colonne de silice (hexane/ acétate d'éthyle: 9/1). Le rendement est de 56% (9,16 g; 38,64 mmoles).

Etape d: préparation du 10-bromo-1-(tétrahydropyran-2-oxy)décane: (C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>Br=321): même réaction que l'étape b. Le rendement est de 75%.

Etape e: préparation de la sulfone linéaire: (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>S=278). On solubilise du phénylsulfonate de sodium (7,55 g; 46 mmoles) dans 60 ml de méthanol anhydre et, à 0°C et à l'abri de la lumière, on ajoute lentement le bromure de géranyl (10 g; 46 mmoles) solubilisé dans 5 ml de méthanol. Après 1 heure de réaction, le milieu est hydrolysé, extrait avec du dichlorométhane, séché avec du sulfate de magnésium et évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur silice (hexane/éther: 90/10). Le rendement est de 61% (7,80 g; 28,06 mmoles). TLC (hexane/éther: 8/2): R<sub>f</sub>=0,28.

Etape f: préparation de la sulfone cyclisée: (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>S=278). On solubilise la sulfone obtenue à l'étape e (6,35 g; 22,8 mmoles) dans 10 ml d'acide acétique puis, à 12°C on ajoute de l'acide sulfurique concentré (32 éq; 19,8 ml) et on laisse réagir pendant 30 minutes à cette température. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution saturée de bicarbonate de sodium à 2 reprises, extrait avec du dichlorométhane puis séché avec du sulfate de magnésium et évaporé. Le produit est purifié par recristallisation dans l'hexane. Le rendement est de 81% (5,10 g; 18,31 mmoles). TLC (hexane/éther: 5/5): R<sub>f</sub>=0,63.

Etape g: préparation de l'hydroxy-sulfone: (C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>S=534). On solubilise la sulfone cyclisée (200 mg; 0,70 mmoles; 1,1 éq) dans du THF anhydre et quelques gouttes d'HMPT anhydre. A -78°C, on ajoute 1 éq de Butyllithium (0,63 mmoles) et laisse réagir à -78°C pendant 2 heures. On ajoute l'aldéhyde obtenu à l'étape b (162 mg; 0,63 mmoles; 1 éq) solubilisé dans du THF et on laisse réagir pendant 2 heures à -78°C. Le milieu est hydrolysé, extrait 3 fois à l'éther, séché avec du sulfate de magnésium et évaporé. On purifie par chromatographie sur silice (hexane/ éther: 70/30 puis 65/35). Le rendement est de 54% (184 mg; 0,34 mmoles). TLC (hexane/éther: 5/5): R<sub>f</sub>=0,32.

Etape h: préparation du diène: (C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>=376). On solubilise l'hydroxy-sulfone préparée à l'étape g (198 mg; 0,37 mmole) dans 40 ml de méthanol anhydre. A 0°C, on ajoute du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (236 mg; 1,66 mmoles) et de l'amalgame de sodium (6% Hg; 2,37 g). On laisse réagir à 4°C pendant 7

heures avant d'hydrolyser le milieu réactionnel. On extrait 3 fois avec du dichlorométhane et on purifie le produit par chromatographie sur silice (hexane/éther: 9/1). Le rendement est de 70% (98 mg 0,26 mmole). TLC (hexane/éther: 8/2):  $R_f=0,69$ .

5 Etape l: préparation de l'oléfine: ( $C_{25}H_{46}O_2=378$ ). On solubilise le diène (98 mg; 0,26 mmole) dans 20 ml de méthanol et on ajoute 100 mg de Pd sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. Après 8 heures de réaction on filtre sur célite et on évapore le solvant. Le rendement est de 70%. TLC (hexane/éther: 8/2):  $R_f=0,29$ .

10 Etape j: préparation de la sulfone à chaîne longue par couplage avec le bromure préparé à l'étape l: ( $C_{31}H_{50}O_4S=518$ ). On solubilise la sulfone cyclisée (1,7 g; 6 mmoles) dans du THF anhydre et 1 éq de tBuOK à température ambiante. On ajoute ensuite le bromure (1 mmole) à -30°C. On laisse revenir le milieu réactionnel à température ambiante et on laisse réagir pendant 5 heures. On hydrolyse le milieu et on extrait 3 fois avec l'éther et évapore le solvant. On purifie par chromatographie sur silice (hexane/éther: 9/1). Le rendement est de 60% (1,86 g; 3,60 mmoles). TLC (hexane/éther: 8/2):  $R_f=0,28$ .

15 Etape k: préparation de l'oléfine par désulfonation: ( $C_{25}H_{46}O_2=378$ ). On solubilise la sulfone préparée à l'étape j (518 mg; 1 mmole) dans 40 ml de méthanol anhydre. A 0°C, on ajoute du  $Na_2HPO_4$  (142 mg; 4,3 mmoles) et de l'amalgame de sodium (6% Hg; 1,8 g). On laisse réagir à température ambiante pendant une nuit avant d'hydrolyser le milieu réactionnel. On extrait 3 fois avec de l'éther et on purifie le produit par chromatographie sur silice (hexane/éther: 9/1). Le rendement est de 99% (374 mg; 0,99 mmole). TLC (hexane/éther: 7/3):  $R_f=0,72$ .

20 Etape l: obtention du composé A1: ( $C_{20}H_{38}O=294$ ). On solubilise l'oléfine dans du méthanol à température ambiante pendant 30 minutes avec de l'acide *p*-toluènesulfonique. On évapore le méthanol et on reprend le résidu avec de l'éther. On lave la phase organique avec une solution de  $NaHCO_3$ , on séche avec du  $MgSO_4$  et on évapore. On purifie par chromatographie sur silice (hexane/éther: 9/1). Le rendement est de 95%. TLC (hexane/éther: 9/1):  $R_f=0,15$ .

Etape m: obtention du composé B<sub>1</sub>: (C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O=296). On soumet à une hydrogénéation catalytique poussée (H<sub>2</sub>/Pd/C) dans du méthanol (voir préparation de l'éther de tétrapyrannyle). TLC (hexane/éther: 9/1): R<sub>f</sub>=0,15.

5

**II) Essais biologiques *in vitro*: différenciation et survie de neurones cérébraux en présence des dérivés de l'invention.**

Les dérivés de l'invention ont été testés sur des neurones du système nerveux central en culture primaire. Les cultures sont préparées à partir de cerveaux d'embryons de rats. Les neurones proviennent de l'une des trois zones cérébrales suivantes: le cortex à partir d'embryons de 14 jours, l'hippocampe et le septum à partir d'embryons de 18 jours. Les cellules sont ensemencées à faible densité (10<sup>4</sup> cellules/lamelle) sur des lamelles prétraitées avec de la poly-L-lysine. Les cellules sont maintenues dans un milieu de culture chimiquement défini. Les dérivés testés sont ajoutés le premier jour de la mise en culture des cellules à des doses variant de 10<sup>-10</sup> M à 10<sup>-4</sup> M. Le changement de milieu se fait tous les quatre jours avec addition des composés à tester.

On suit la survie des neurones en culture à l'aide d'un microscope en contraste de phase. De manière générale, les cellules témoins dégénèrent après 11 jours de culture alors que le nombre de cellules survivantes est significativement élevé dans les cultures traitées avec les dérivés de l'invention.

Après 48 heures de culture, les neurones traités avec les composés de l'invention émettent des prolongements plus longs et plus ramifiés, ceci a été démontré par immunocytochimie contre les neurofilaments  $\gamma\gamma$  (marqueur spécifique des neurones). Il a également été montré, par immunocytochimie, l'effet de certains composés de l'invention sur l'expression de la choline acétyltransférase (CAT), marqueur spécifique des neurones cholinergiques. Ces résultats indiquent un effet des composés de l'invention testés sur la différenciation neuronale.

On observe également que les neurones traités émettent des prolongements plus longs et plus ramifiés et forment un réseau intriqué de neurites. Ces résultats montrent une plus grande plasticité du tissu nerveux

laquelle *in vivo* correspond à une capacité accrue de régénération et à la mise en place de nouveaux circuits neuronaux.

Les composés testés favorisent la différenciation et la survie des neurones de cortex et de l'hippocampe. L'utilisation de ces modèles de culture permet de mettre en évidence la spécificité d'action des composés sur chaque type de cellule.

Il ressort des résultats obtenus que, *in vitro* les dérivés de l'invention ont un effet comparable à celui de certains facteurs neurotrophiques protéiques tel que le facteur de croissance (bFGF).

10 A titre d'exemple, l'effet du composé A<sub>1</sub>, sur la survie des neurones de cortex est représenté sur la figure 3. Ce graphique représente le nombre de neurones survivants après 10 jours de culture. Le nombre de neurones survivants dans les cultures traitées par le composé A<sub>1</sub> (10<sup>-5</sup>M) est significativement augmenté par rapport aux cellules témoins ( $t(2) = 6,75$ ; \*  $p < 0,02$ , t de Student).

15 A titre d'autre exemple, l'effet du composé A<sub>3</sub>, sur la survie des neurones de cortex est représenté sur la figure 4. Ce graphique représente le nombre de neurones survivants à différents temps de culture. Le nombre de neurones survivants dans les cultures traitées par le composé A<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup>M) est significativement augmenté par rapport aux cellules témoins (\*  $p < .05$ ; \*\*  $p < .01$ ; \*\*\*  $p < .001$ ; t-Test). L'effet du composé A<sub>3</sub> est aussi observé à d'autres concentrations: 10<sup>-10</sup>M, 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-7</sup>M et 10<sup>-6</sup>M.

20 Par ailleurs les propriétés décrites ci-dessus ne sont pas limitées aux neurones d'origine cérébrale, mais s'appliquent également au système nerveux périphérique. Ainsi une lésion des nerfs périphériques entraîne une dégénérescence axonale, appelée dégénérescence wallérienne. Il peut y avoir perte de la continuité du nerf et donc de la fonction de l'organe normalement innervé. Les composés de l'invention favorisent la régénérescence de la partie proximale du nerf lésé, ce qui a pour effet de permettre la réinnervation de l'organe terminal. Cet action permet de rétablir la fonction de l'organe réinnervé grâce au traitement à l'aide de ce composé.

### III) Essais biologiques *in vivo*: activités neurotrophique et promérisante des composés de l'invention

1) Activité neurotrophique *in vivo*: Effet de restauration fonctionnelle

Les molécules entrant dans le cadre de l'invention ont une activité neurotrophique *in vivo*. D'un point de vue morphologique, ces molécules ont un effet de différenciation et un effet de survie neuronale dans divers modèles de lésion. D'un point de vue fonctionnel, les composés de l'invention ont un effet de restauration comportementale et biochimique, notamment sur le modèle de la lésion du noyau basal magnocellulaire (NBM) chez le rat (Dubois *et al.*, 1985). L'activité des composés de l'invention peut être démontrée à l'aide du modèle expérimental décrit ci-dessous.

On observe que les rats porteurs de la lésion du NBM et ayant reçu un traitement avec un composé de l'invention ne développent pas d'hyperactivité locomotrice nocturne, par comparaison au groupe NBM/Témoin. Pendant 13 jours, des rats non lésés (NL) ou porteurs de la lésion du NBM (NBM) sont traités par voie intrapéritonéale ou orale soit avec une solution témoin, constituée par le solvant seul, soit avec un\_composé de l'invention. Deux jours après la fin du traitement (soit 12 jours après la lésion), l'activité locomotrice nocturne est enregistrée dans des actimètres automatisés pendant 9 heures.

Les rats porteurs de la lésion du NBM ayant reçu un traitement avec un composé de l'invention ne présentent pas de déficit d'apprentissage d'une réponse d'évitement passif. Pendant 13 jours, des rats non lésés (NL) ou porteurs de la lésion du NBM (NBM) sont traités par voie intrapéritonéale ou orale soit avec une solution témoin, constituée par le solvant seul, soit avec un composé de l'invention. Neuf jours après la fin du traitement (soit 21 jours après la lésion), les rats sont soumis à l'apprentissage d'une réponse d'évitement passif. Au cours d'un essai, le rat est placé au bout d'une allée étroite et fortement illuminée conduisant à un large compartiment obscur. Il doit apprendre à rester passivement sur l'allée pendant un délai minimum de 300 secondes (critère d'apprentissage); chaque entrée dans le compartiment, dont la latence est mesurée en secondes, est punie par la délivrance d'un choc électrique (0,5 mA pendant 5 s). La séance d'apprentissage comporte autant d'essais nécessaires à l'obtention du critère. On note un déficit d'apprentissage dans le groupe NBM/Témoin et une courbe d'apprentissage du groupe NBM/composé similaire à celle des groupes NL.

## 2) Activité promnésiante

L'activité promnésiante des molécules entrant dans le cadre de l'invention est mise en évidence à l'aide de plusieurs épreuves comportementales sollicitant la mémoire spatiale de travail, de référence, à court terme (comportement d'alternances spontanées ou renforcées, discrimination spatiale dans un labyrinthe en T), la mémoire spatiale à long terme (reconnaissance d'un environnement initialement nouveau; rétention d'une réponse d'évitement passif), la mémoire olfactive (mémoire sociale d'un jeune congénère), visuelle (comparaison non différée d'échantillons). Dans tous les cas, une facilitation de la mise en mémoire est observée chez les animaux ayant reçu par voie orale ou intra-péritonéale une solution contenant ces molécules.

Si l'on mesure le comportement d'alternances spontanées dans un labyrinthe en T, les rats ayant reçu cet alcool gras à chaîne longue ont un pourcentage d'alternances spontanées plus élevé que ceux traités avec la solution témoin; ce qui indique une facilitation de la mémoire de travail à court terme.

Des rats reçoivent pendant 10 jours des injections intrapéritonéales quotidiennes d'une solution témoin ou d'un composé de l'invention. Le jour de la dernière injection, chaque animal est soumis à une séance d'habituation de 10 minutes pendant lesquelles il peut librement explorer le labyrinthe en T. Cinq jours après, le comportement d'alternances spontanées est mesuré au cours de 11 essais successifs.

Par exemple, la figure 5 montre un effet facilitateur du composé A3 sur le comportement d'alternances spontanées chez la souris. Le groupe qui a reçu pendant 13 jours des injections intrapéritonéales du composé A3 à la dose de 0,3 mg/kg a un pourcentage d'alternances spontanées supérieur au hasard ( $\text{Chi}^2=13,22, p<0,001$ ) et à celui du groupe ayant reçu la solution témoin ( $\text{Chi}^2=4,68, p<0,005$ ).

En outre, l'effet promnésiant des composés de l'invention est généralisable à plusieurs formes de mémoire (mémoire à court/long terme; mémoire de travail/référence; mémoire spatiale, olfactive, visuelle). Cet effet apparaît après un traitement répété ou unique par un composé de l'invention, par exemple le composé A3, administré par voie orale ou intra-péritonéale. Ainsi, la figure 6 montre un exemple d'amélioration de la discrimination entre un objet nouveau

et un objet familier dans une épreuve de reconnaissance d'objets. Deux groupes de rats, traités par injection intrapéritonéale unique, soit avec la solution témoin, soit avec 0,3 mg/kg de composé A3, sont soumis à deux séances de discrimination d'objets comprenant chacune 2 essais. Au cours du premier essai, une paire d'objets identiques est présentée au rat. Au cours du deuxième essai, un des deux objets précédemment présentés (objet familier) est apparié avec un nouvel objet. Le deuxième essai est effectué 5 minutes après le premier (séance 1) ou 24 heures après (séance 2). La capacité de discrimination d'objets est évaluée par le rapport entre le temps consacré à explorer l'objet nouveau et le temps total d'exploration des deux objets au cours des deux séances. Si les deux paires d'objets sont présentées dans un intervalle de temps de 5 minutes, les deux groupes de rats sont capables de discriminer l'objet nouveau du familier. Par contre, si l'intervalle est de 24 heures, les rats traités à la solution témoin perdent cette capacité, ce qui n'est pas le cas des rats traités au composé A3 (ANOVA,  $F(1,18)=9,77, p<0,0005$ ), qui la conservent.

### 3) Greffes nerveuses

Un traitement pharmacologique n'est pas le seul moyen qui permette de favoriser une récupération fonctionnelle à la suite d'une lésion du système nerveux central. En effet il est possible de remplacer certains neurones ou de compenser un déficit en neurotransmetteur à l'aide d'une greffe nerveuse. Le tissu greffé consiste le plus souvent en tissu nerveux foetal. La greffe peut agir à plusieurs niveaux pour stimuler la récupération fonctionnelle. Elle peut reconstituer un circuit qui a été interrompu par une lésion ou peut fournir des neurotransmetteurs nécessaires au fonctionnement de certains circuits neuronaux.

Les composés de l'invention sont capables de favoriser la prise d'une greffe nerveuse grâce à leur capacité à stimuler la survie et la différenciation neuronale. En particulier l'extension de neurites à partir du tissu nerveux greffé favorise sa mise en contact avec les tissus environnants et donc le fonctionnement du circuit neuronal. Par ailleurs une bonne survie neuronale au sein de la greffe est nécessaire afin d'assurer son fonctionnement à long terme.

5 De ces essais *in vivo*, il ressort clairement que les composés de l'invention peuvent être utilisés comme neurotrophiques dans les maladies neurodégénératives grâce à leur effet de récupération fonctionnelle à la suite de lésions du tissu nerveux mais aussi comme nootropes, grâce à leur effet facilitateur des capacités mnésiques.

*In vitro*, les dérivés de l'invention favorisent la différenciation et la survie neuronale. *In vivo*, ils sont capables de compenser le déficit de mémoire après lésion cérébrale.

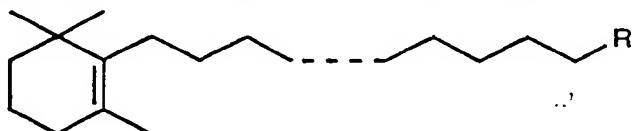
10 Les dérivés de l'invention peuvent donc être avantagément utilisés dans certaines maladies neurodégénératives. Leur bonne biodisponibilité et l'obtention de produits chimiquement et optiquement purs en feront des outils thérapeutiques particulièrement utiles.

15 Il est important de rappeler, comme indiqué au début, que la variété des applications des composés selon l'invention, liée à leur différence de toxicité, exclue de désigner l'un quelconque d'entre eux comme étant le plus "utile". On peut seulement relever, dans le cadre de l'appréciation de leurs utilités respectives, que l'activité des composés selon l'invention peut se situer à des doses extrêmement faibles, pouvant descendre jusqu'à 0,01 mg/kg, dans le cas de l'administration chronique en vue de l'obtention d'effets prononcés.

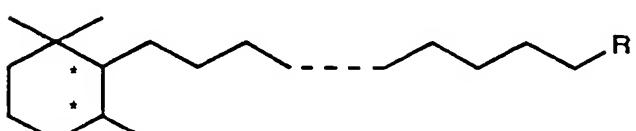
20 En effet, il est établi que les composés selon l'invention présentent la caractéristique unique de ralentir la mort neuronale dont l'une des conséquences est un déficit cognitif et même d'exhiber une capacité de restauration neuronale, donc d'améliorer cette capacité.

## REVENDICATIONS

1. Nouveaux dérivés d'alcools gras à longue chaîne, caractérisés par les formules générales suivantes:



ou



avec

$$R = -CH_2CH_2CH_2OH$$

ou

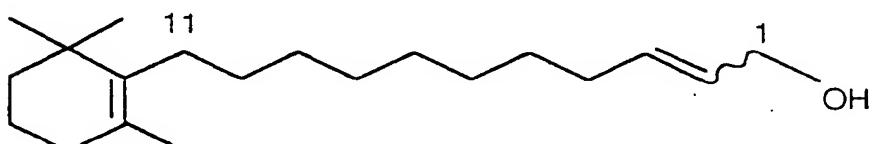
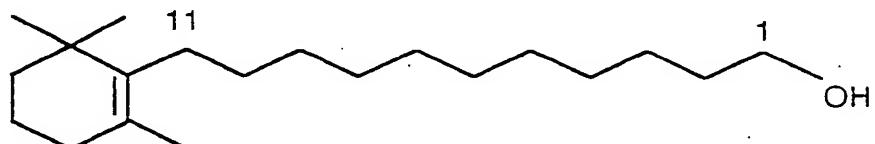
**R** = -CH=CHCH<sub>2</sub>OH, *cis* ou *trans*

5

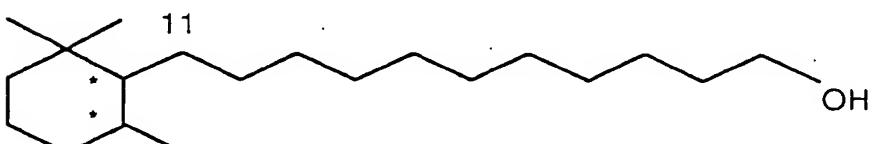
dont la chaîne latérale hydrocarbonée linéaire compte de 7 à 25 atomes de carbone, est saturée ou comporte une double liaison de configuration *cis* ou *trans* en  $\beta$  de la fonction alcool, mais ne comporte aucune ramifications.

10 2. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que ladite chaîne latérale linéaire compte 11 atomes de carbone ;

3. Dérivés selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'ils ont une formule choisie entre

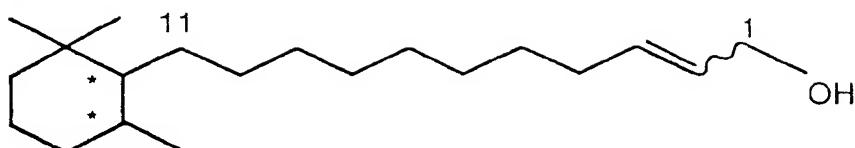


(cis) ou (trans)



15

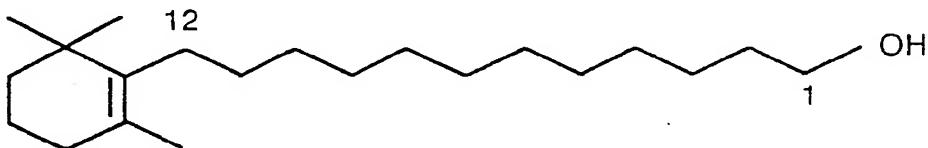
et



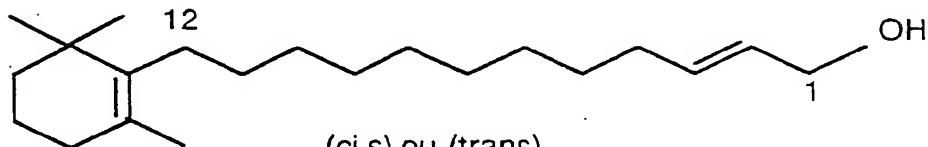
(cis) ou (trans)

4. Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que ladite chaîne linéaire compte 12 atomes de carbone ;

5. Dérivés selon la revendication 4, caractérisés en ce qu'ils ont une formule choisie entre



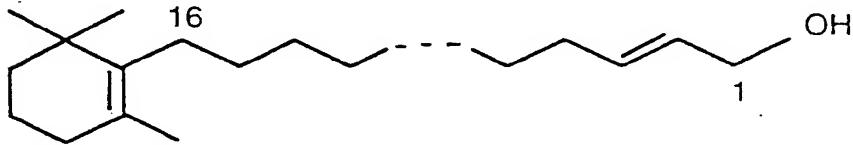
et



(cis) ou (trans)

10 6. Dérivés selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite chaîne latérale linéaire compte 16 atomes de carbone.

7. Dérivé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il a la formule



15

8. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un dérivé selon l'une des revendications 1 à 7, à une dose efficace de l'ordre de 0,01-100 mg/kg par administration unique ou répétée ou par administration chronique, cette dose se situant alors entre 0,01 et 3 mg/kg, ladite composition étant administrable par voie topique, orale, intra-cérébrale, intra-musculaire, intra-veineuse ou

parentérale, la composition comprenant en outre une quantité adéquate d'un excipient physiologiquement acceptable.

9. Compositions selon la revendication 8, pour utilisation dans le traitement des maladies neurodégénératives telles que la maladie

5 d'Alzheimer.

10. Compositions selon la revendication 8, pour utilisation dans le traitement de toute situation entraînant une diminution des capacités d'apprentissage et de mémoire et en particulier au cours du vieillissement cérébral, l'intervalle de doses ou par administration

10 chronique se situant alors entre 0,01 et 3 mg/kg.

11. Compositions selon la revendication 8, pour utilisation pour favoriser la récupération fonctionnelle à la suite de lésions du tissu nerveux.

12. Compositions selon la revendication 8, pour utilisation pour améliorer les fonctions cognitives d'un sujet sain.

13. Compositions selon la revendication 8, pour utilisation pour favoriser la prise de greffes de tissu nerveux d'origine foetale ou adulte.

14. Compositions selon la revendication 8, pour utilisation pour favoriser la régénération de nerfs périphériques, en particulier à la

20 suite de lésions traumatiques ou neuropathiques.

Figure 1

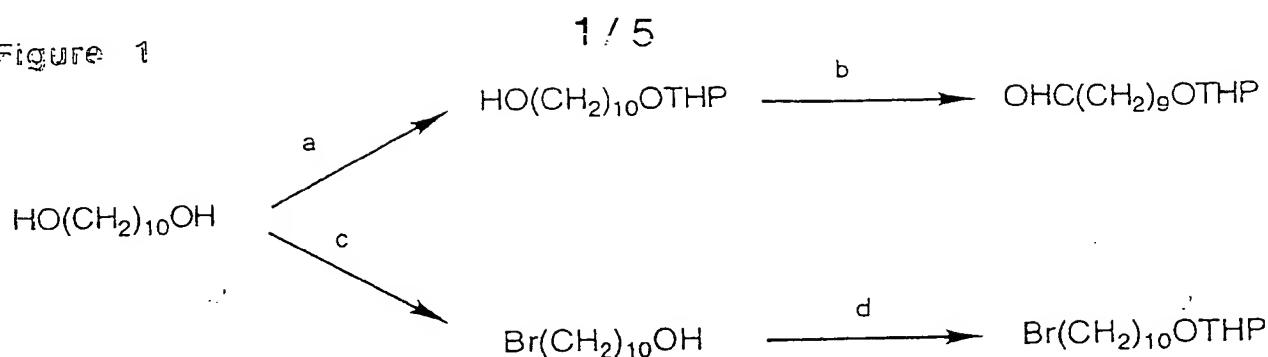


Figure 2

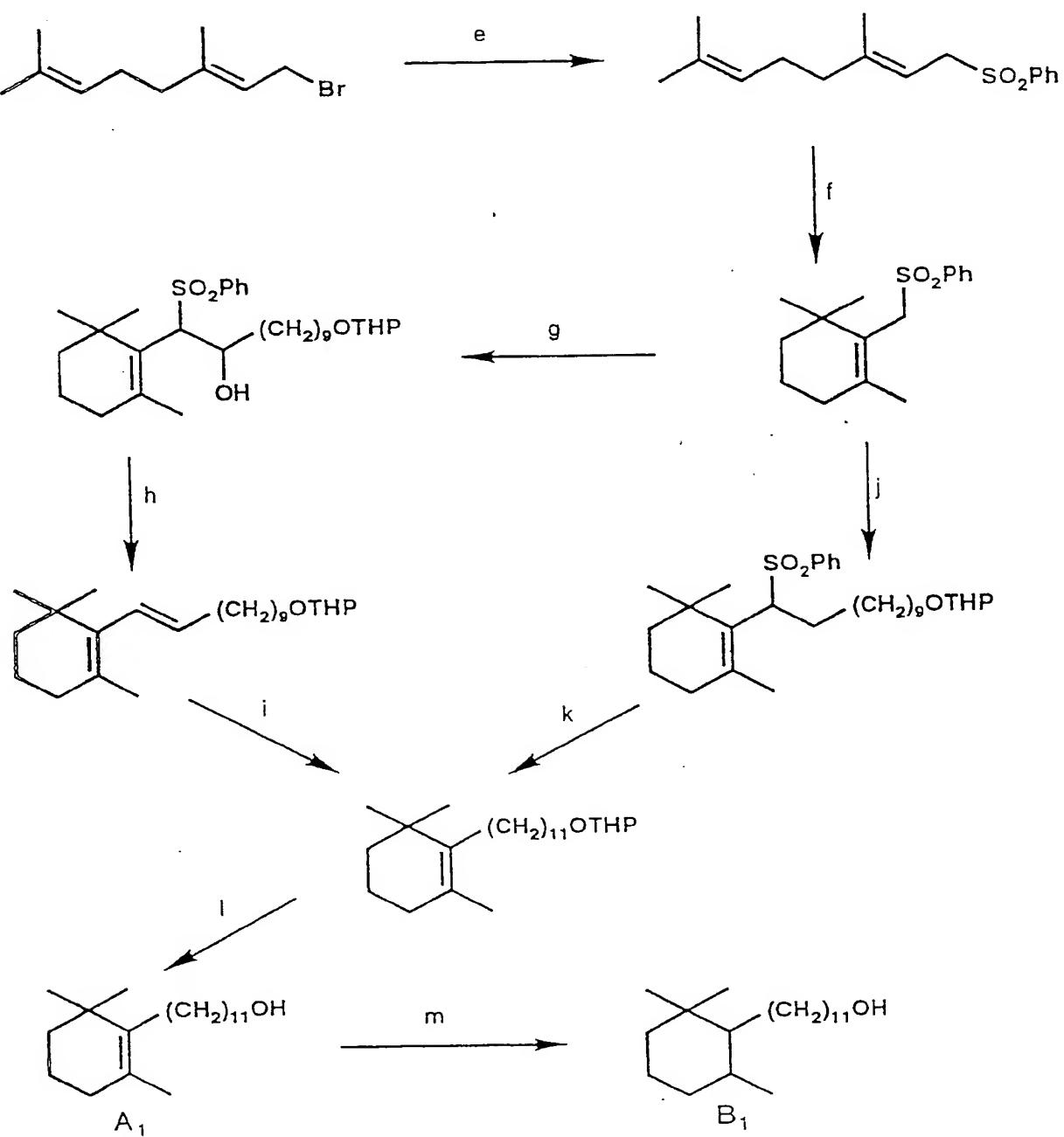
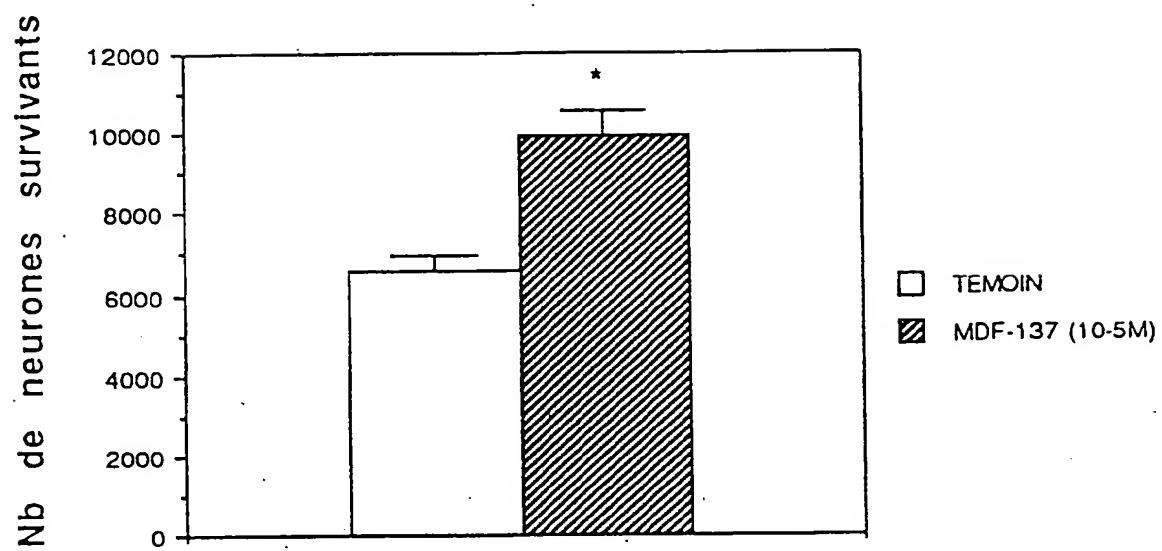
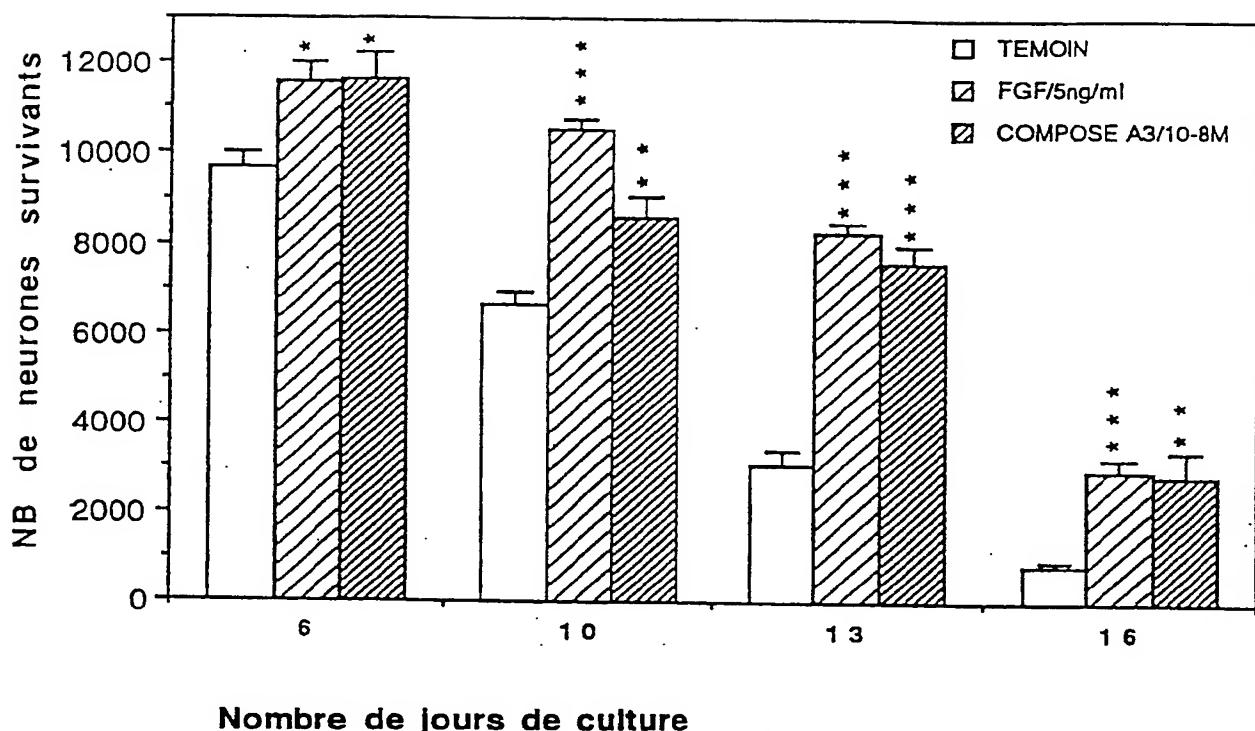
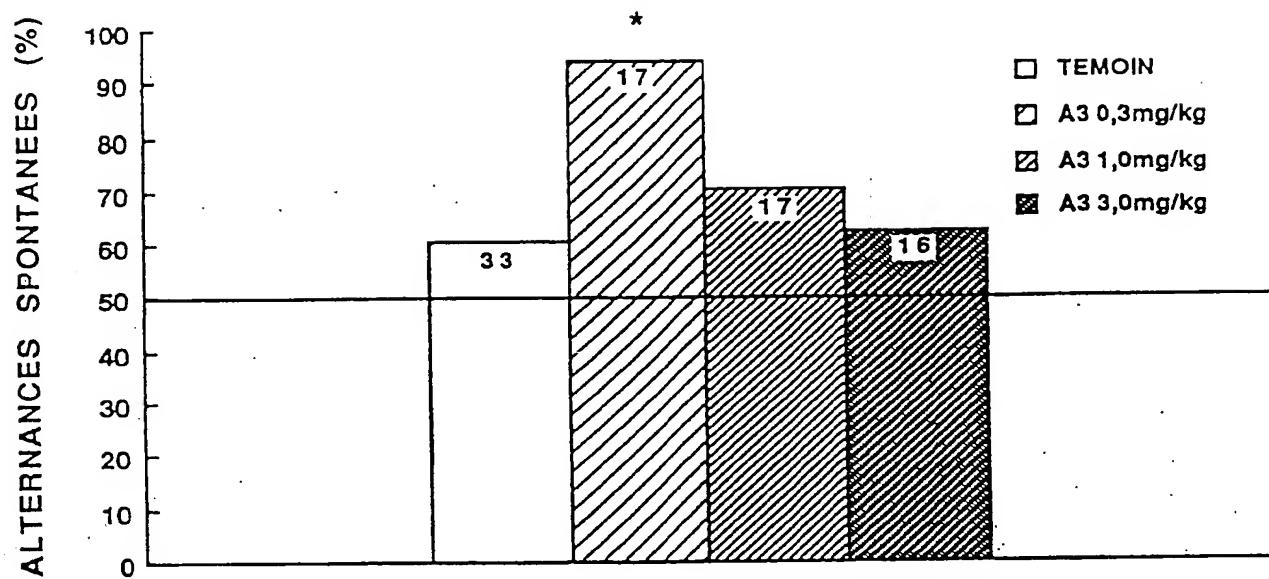
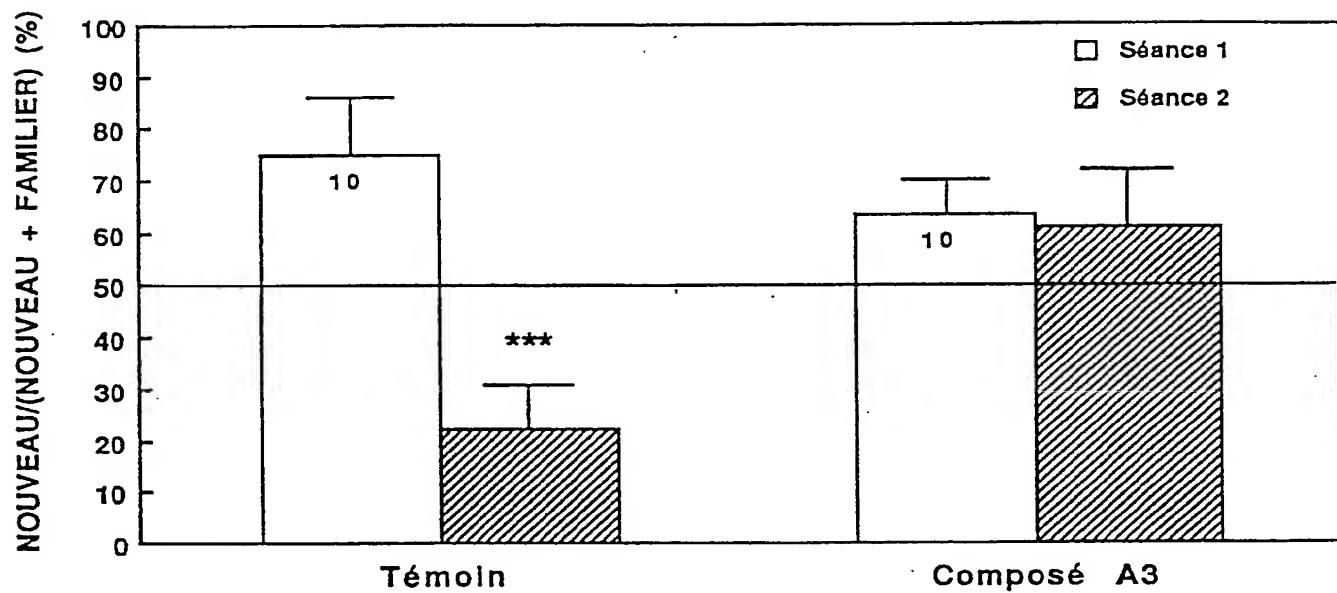


Figure 3



**Figure 4****FEUILLE DE REMPLACEMENT**

**Figure 5****FEUILLE DE REMPLACEMENT**

**Figure 6****FEUILLE DE REMPLACEMENT**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/01059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 C07C403/08 C07C31/135 C07C33/025 A61K31/045

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 5 C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,3 578 686 (B.F. TULLAR ET AL.) 11 May 1971 * column 6, (10) and column 8, (33) and (36) *	1
A	FR,E,78 168 (FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 7 May 1962 see page 6 - page 8 ----	1,2
A	WO,A,91 05754 (MEDAFOR) 2 May 1991 cited in the application see claims -----	1,9-14

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 January 1994

Date of mailing of the international search report

12.01.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bonnevalle, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/01059

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-3578686	11-05-71	NONE		
FR-E-78168		NONE		
WO-A-9105754	02-05-91	FR-A- 2653117 19-04-91 FR-A- 2658185 16-08-91 EP-A- 0448697 02-10-91 JP-T- 4502167 16-04-92 US-A- 5243094 07-09-93		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 93/01059

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 5 C07C403/08 C07C31/135 C07C33/025 A61K31/045

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche utilisés

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US,A,3 578 686 (B.F. TULLAR ET AL.) 11 Mai 1971 * colonne 6, (10) et colonne 8, (33) et (36) * ---	1
A	FR,E,78 168 (FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 7 Mai 1962 voir page 6 - page 8 ---	1,2
A	WO,A,91 05754 (MEDAFOR) 2 Mai 1991 cité dans la demande voir revendications -----	1,9-14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Janvier 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12. 01. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tél: (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bonnevalle, E

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 93/01059

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US-A-3578686	11-05-71	AUCUN		
FR-E-78168		AUCUN		
WO-A-9105754	02-05-91	FR-A- 2653117 FR-A- 2658185 EP-A- 0448697 JP-T- 4502167 US-A- 5243094	19-04-91 16-08-91 02-10-91 16-04-92 07-09-93	

